

**АННОТАЦИЯ**  
**научно-технического отчета**  
**о выполнении Государственного контракта**  
**№ 14.740.11.0502 от 1 октября 2010 г.**

Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.2 «Проведение научных исследований целевыми аспирантами»

по проекту «Поиск эффективных молекулярно-генетических стресс-маркеров для мониторинга и прогнозирования состояния экосистемы оз. Байкал в условиях увеличивающейся антропогенной нагрузки»

В результате роста промышленного производства увеличивается негативная нагрузка на живые организмы. Кроме того, возрастающая антропогенная нагрузка, как полагают ряд ученых, ведет к глобальным климатическим изменениям. Водные организмы более остальных подвержены воздействию неблагоприятных факторов, поскольку уровень их жизнедеятельности напрямую зависит от среды обитания.

В условиях всё возрастающей антропогенной нагрузки на водоёмы мира актуальным представляется детальное исследование механизма множественной резистентности к ксенобиотикам (MXR – multixenobiotic resistance), являющегося одним из базовых механизмов стресс-адаптации на клеточном уровне. Механизм MXR обеспечивают способности различных организмов противостоять токсическому воздействию широкого спектра веществ. Другими словами, система MXR – это тот «заслон», который спасает живые организмы в целом и водные организмы в частности от отравления ядами различного происхождения, в том числе антропогенного.

Изменения условий существования могут приводить к изменению структуры биологических сообществ. Так, было показано, что глобальные климатические изменения уже отразились на структуре планктонных сообществ озера Байкал (Kozhova, 1987; Поповская, 1989; Hampton et al., 2008). Логично предположить, что и токсическое загрязнение озера может привести к изменениям в структуре его биологических сообществ.

Таким образом, целью данного проекта являлся поиск уникальных особенностей функционирования механизма множественной устойчивости к ксенобиотикам (MXR) у байкальских эндемичных видов и генетических последовательностей белков переносчиков данного механизма, перспективных для использования в качестве молекулярно-генетических стресс-маркеров для мониторинга и прогнозирования состояния экосистемы оз. Байкал в условиях увеличивающейся антропогенной нагрузки.

Объектами данного исследования выбраны представители группы бентосных организмов Байкала - Amphipoda (Crustacea).

Из эндемичных байкальских видов были выбраны амфиподы, обитающие в литорали: *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.), *E. verrucosus* (Gerstf.), *Gmelinoides fasciatus* (Stebb.), *Pallasea cancelloides* (Gerstf.), и глубоководный вид *Ommatogammarus flavus* (Dyb.). В качестве палеарктических аналогов были выбраны амфиподы видов *Gammarus lacustris* Sars, *G. pulex* (Linn), *G. tigrinus* (Sexton).

В результате выполнения исследования было проведено определение активности механизма множественной устойчивости к ксенобиотикам (MXR) в норме и при изменениях, индуцированных стрессовыми воздействиями у байкальских эндемичных организмов. Показано, что у исследуемых организмов функционирует механизм множественной устойчивости к ксенобиотикам. Установлено, что температурное воздействие не вызывает изменения активности выведения препарата родамин С из тканей амфипод. Воздействие токсического стресса хлористого кадмия и гуминсодержащих препаратов снижает активность выведения родамина С из тканей амфипод.

В результате проведенного исследования была предложена методика получения нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих специфические белки переносчики MXR у байкальских эндемиков, адаптированная для амфипод. Проведено клонирование и секвенирование генов стрессовых белков и гена "house-keeper" для последующей оценки экспрессии их генов в норме и при изменениях, индуцированных

стрессовыми воздействиями. Получены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих *p-гликопротеин*, специфический белок-переносчик MXR у байкальских эндемичных видов амфипод *E. cyaneus*, *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *G. fasciatus*, а так же у палеарктического *G. lacustris*. Так же получены нуклеотидные последовательности гена *актина*, используемого в качестве house-keeper, для ряда байкальских эндемичных и палеарктических видов амфипод.

Также была проведена обработка данных по экспрессии гена *p-gp* и активности фермента глутатион S-трансферазы. Для оценки активности экспрессии гена *P-gp* применяли метод количественной полимеразой цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (кПЦР). Исходя из того, что амфиподы отличаются по своим молекулярно-биохимическим параметрам от традиционных модельных объектов, для них была разработана адаптированные методики пробоподготовки и дальнейшей обработки с помощью молекулярно-биологических методов анализа. Показано, что при воздействии температурного и токсического стрессов происходит увеличение экспрессии гена *p-gp*, в то время как экспозиция в растворах гуминсодержащего препарата не вызывали изменений в экспрессии данного гена.

Как показывают материалы исследований характер изменения активности фермента глутатион S-трансферазы у экспонированных при гипертермии амфипод был не линейным, наблюдались как периоды роста активности, так и периоды снижения. В то же время у амфипод наблюдались только однонаправленные изменения активности ферментов в сторону роста или падения, относительно контрольного уровня. Анализ активности глутатион S-трансферазы при воздействии температурного стресса позволил выявить прямую зависимость направления активности фермента от терморезистентного статуса вида. У наиболее термоустойчивых *G. fasciatus* и *G. lacustris* отмечено повышение активности фермента (при максимальном значении температуры) или отсутствие реакции (при минимальном значении



температуры). У других видов, по мере снижения их терморезистентных способностей отмечали либо отсутствие реакции, либо падение активности глутатион S-трансферазы.

Показана зависимость между активностью фермента и показателем токсикорезистентности вида. У более токсикорезистентных палеарктических видов *G. lacustris* и *G. tigrinus* не отмечали снижение активности глутатион S-трансферазы, в то время как у обоих чувствительных байкальских видов *E. cyaneus* и *E. verrucosus* в условиях интоксикации происходило снижение ее активности.

Показана общая для палеарктических видов реакция увеличения активности фермента при экспозиции их в растворах гуминсодержащих препаратов, в то время как у байкальских эндемичных видов происходило снижение или не происходило изменения активности исследуемого фермента.

На основе полученных данных было сделано заключение о том, что изменение активности механизма множественной устойчивости к ксенобиотикам можно успешно рекомендовать к использованию в качестве биомаркеров стрессового воздействия у байкальских организмов.

Результаты, полученные в ходе выполнения работ, легли в основу разрабатываемой адаптированной методики оценки стрессового ответа у байкальских эндемиков. Данная методика позволит проводить мониторинговые исследования экосистем оз. Байкал и Байкальского региона.

Материалы, полученные в ходе выполнения исследования, включены в учебный процесс биологического факультета ИГУ (в программы лабораторного практикума «Большой практикум по экологии» и лекционного курса «Современные основы Лимнологии»), а также будут использоваться при составлении программ международных летних школ, проводимых на базе ИГУ, совместно с Кильским университетом (ФРГ) и Уэлсли колледжем (США).

Полученные экспериментальные данные включены в основу

диссертационной работы руководителя проекта.

Перечень научных работ, опубликованных по результатам исследования:

1) Павличенко В.В. "Стресс-реакции пресноводных амфипод в условиях гипертермии и при интоксикации ксенобиотиками"/ Дис. ... канд. биол. наук. - Иркутск, 2012. – 164 с.

2) Pavlichenko V.V., Luckenbach T., Timofeyev M.A. Increased environmental temperature induced *P-glycoprotein* gene expression in common freshwater amphipod, *Gammarus lacustris* Sars//4<sup>th</sup> International symposium on the environmental physiology of ectotherms and plants (Rennes, July 18 – 22, 2011). – 2011. – P. 110.

3) Павличенко В.В., Протопопова М.В., Аксенов-Грибанов Д.В., Гурков А.Н., Люкенбах Т., Тимофеев М.А. Идентификация белка Р-гликопротеина и оценка его экспрессии в условиях воздействия токсического и температурного стрессовых факторов у палеарктического вида амфипод *Gammarus lacustris* Sars// Материалы II Всероссийской научно-практической конференции «Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле» (Иркутская область, пос. Листвянка, 23 – 27 августа 2011 г.). – Иркутск: Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2011. – С. 157 – 163.

4) Vasily Valerievich Pavlichenko, Till Luckenbach, Marina Vladimirovna Protopopova, Denis Viktorovich Axenov-Gribanov, Maxim Anatolievich Timofeyev. Increased environmental temperature induces *P-glycoprotein* expression in common freshwater amphipod *Gammarus lacustris* Sars // New frontiers in Monitoring European Biodiversity (MEB). The role and importance of amphipod crustaceans. ABSTRACT VOLUME (Orto Botanico, Palermo, Italy, 27-29 September). - 2011. - P. 49-50.

5) Shatilina Z.M., Riss H.W., Protopopova M.V., Trippe M., Meyer E.I., Pavlichenko V.V., Bedulina D.S., Axenov-Gribanov D.V., Timofeyev M.A. The role of the heat shock proteins (HSP70 and sHSP) in the thermotolerance of freshwater amphipods from contrasting habitats/ Journal of thermal biology. – 2011. – V. 36, I. 2. – P. 142 – 149.

6) Protopopova M.V., Takhteev V.V., Shatilina Zh.M., Pavlichenko V.V., Axenov-Gribanov D.V., Bedulina D.S., Timofeyev M.A. Small HSPs molecular weights as new indication to the hypothesis of segregated status of thermophilic relict *Gmelinoides fasciatus* among Baikal and Palearctic amphipods // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2011. - V.7. – No 2. – P. 175-182.